

免疫组化试剂盒

原理介绍： DAB 染色液是特别敏感的二步法免疫组化试剂盒，适合与兔或鼠源一抗配用。其主要过程为，一抗与切片中的靶抗原形成抗原抗体复合物，酶标羊抗鼠/兔 IgG 聚合物二抗（以多聚葡聚糖分子为骨架，辣根过氧化物酶与羊抗鼠/兔 IgG 形成的聚合物）与抗原抗体复合物中的一抗结合，再利用辣根过氧化物酶催化二氨基联苯胺（DAB）在抗原部位形成棕色显色。

试剂盒规格：100T

试剂盒货号：RC0080R

储存温度：4 度，一年有效

试剂盒组成：

名称	货号	规格	保存条件
DAB原液(100x)	RCD002-A	60 μ l	4℃
DAB稀释液	RCD002-B	6mL	4℃
高敏多聚体hrp抗兔二抗	RCA054	5mL	4℃
3%过氧化氢	RC012	10mL	4℃

***DAB显色工作液：** DAB 原液(100x)：DAB稀释液=1：100的比例现配现用

其他自备试剂： PBS，修复液，苏木素等

操作流程如下：

1、石蜡切片脱蜡至水：依次将切片放入二甲苯 I 15min-二甲苯 II 15min-无水乙醇 I 5min-无水乙醇 II 5min-85%酒精5min-75%酒精5min-蒸馏水洗。

2、抗原修复：组织切片置于盛满EDTA抗原修复缓冲液（PH8.0）的修复盒中于微波炉内进行抗原修复，中火8min至沸，停火8min保温再转中低火7min，此过程中应防止缓冲液过度蒸发，切勿干片；也可以用其他抗原修复方式，比如：95度水浴25min 或者高压等。自然冷却后将玻片置于PBS（PH7.4）中在脱色摇床上晃动洗涤3次，每次5min。

3、阻断内源性过氧化物酶：切片放入3%过氧化氢溶液（双氧水：纯水=1：9），室温避光孵育25 min，将玻片置于PBS（PH7.4）中在脱色摇床上晃动洗涤3次，每次5min。

4、BSA封闭：切片稍甩干后用组化笔在组织周围画圈（防止抗体流走），在圈内滴加用3%BSA均匀覆盖组织，室温封闭30min。

5、加一抗：轻轻甩掉封闭液，在切片上滴加按一定比例配好的第一指标一抗，切片平放于湿盒内4℃孵育过夜。（湿盒内加少量水防止抗体蒸发）

6、加二抗：玻片置于PBS（PH7.4）中在脱色摇床上晃动洗涤3次，每次5min。切片稍甩干后在圈内滴加与一抗相应种属的二抗（HRP标记）覆盖组织，室温孵育50min。

7、DAB显色：将DAB与DAB 稀释液按1：100配制成工作液，玻片置于PBS（PH7.4）中在脱色摇床上晃动洗涤3次，每次5min。切片稍甩干后在圈内滴加新鲜配制的DAB工作液，显微镜下控制显色时间，阳性为棕黄色，自来水冲洗切片终止显色。

8、复染细胞核：Harris苏木素复染3min左右，自来水洗，1%的盐酸酒精分化数秒，自来水冲洗，氨水返蓝，流水冲洗。

9、脱水封片：将切片依次放入75%酒精6min-85%酒精6min -无水乙醇 I 6min -无水乙醇 II 6min -二甲苯 I 5min -二甲苯 II 5min中脱水透明，将切片从二甲苯拿出来稍晾干，中性树胶封片。

10、镜检成像：显微镜镜检，图像采集分析。

石蜡切片免疫组化结果判读：

苏木素复染细胞核为蓝色，DAB显出的阳性表达为棕黄。